

论著·基础研究

全反式视黄酸调控颌骨骨髓间充质干细胞成骨分化双向效应的体外研究

刘媛琪^{1,2*}, 孙思远^{1,2*}, 代庆刚³, 江凌勇^{1,2}, 沈国芳¹

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面科, 上海交通大学口腔医学院, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011; 2. 上海-新西兰口腔医学联合实验室-口腔颌面基础与临床研究中心, 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200011; 3. 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔第二门诊部, 上海交通大学口腔医学院, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011

[摘要] **目的**·探究不同浓度全反式视黄酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 对大鼠颌骨骨髓间充质干细胞 (jaw bone marrow mesenchymal stem cells, jBMSCs) 成骨分化的影响。**方法**·通过全骨髓贴壁法分离培养 4 周龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 jBMSCs。运用流式细胞术鉴定 jBMSCs 表面抗原。利用碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色/茜素红染色、油红 O 染色及阿尔辛蓝染色分别对成骨诱导、成脂诱导及成软骨诱导后的 jBMSCs 进行多向分化潜能检测。分别使用 ATRA 浓度为 0.01、0.1、1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的成骨诱导液对 jBMSCs 进行体外成骨诱导, 并使用二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 作为对照组, 利用 CCK8 进行细胞活力检测。采用 ALP 染色和茜素红染色对各浓度组 jBMSCs 的成骨分化能力进行检测, 并筛选后续实验浓度。利用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)、免疫荧光染色分析不同浓度 ATRA 下 jBMSCs 成骨相关基因 mRNA 与蛋白表达水平。**结果**·流式细胞术分析显示, 98% 以上的 P1 代 jBMSCs 表现为 $\text{CD}29^+\text{CD}90^+\text{CD}31^-\text{CD}45^-$, 与骨髓间充质干细胞表面抗原特点相符。ALP 染色/茜素红染色、油红 O 染色及阿尔辛蓝染色结果证明 P1 代 jBMSCs 具有成骨、成脂、成软骨多向分化能力。ALP 染色/茜素红染色结果显示, 0.01、0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组 jBMSCs 成骨活性和矿化能力较对照组增强, 而继续提升 ATRA 浓度则使成骨活性与矿化能力减弱, 浓度高于 5 $\mu\text{mol/L}$ 时开始低于对照组水平 (均 $P<0.05$)。qPCR 分析发现, 0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组成骨相关基因如 *Alp*、骨唾液酸蛋白 (bone sialoprotein, *Bsp*)、I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ (collagen type I $\alpha 1$, *Col1a1*)、骨钙素 (osteocalcin, *Ocn*) 表达水平较对照组上升, 而继续提升 ATRA 浓度则使基因表达水平下降, ATRA 浓度高于 5 $\mu\text{mol/L}$ 时开始低于对照组水平 (均 $P<0.05$)。免疫荧光染色结果显示, 0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组较对照组成骨相关蛋白成骨细胞特异性转录因子 SP7、ALP 及 OCN 表达增强, 而继续提升 ATRA 浓度则使蛋白表达下降, 浓度高于 5 $\mu\text{mol/L}$ 时开始低于对照组水平 (均 $P<0.05$)。**结论**·较低浓度 (0.1、1 $\mu\text{mol/L}$) ATRA 可促进大鼠 jBMSCs 成骨分化能力, 且该促进效应在 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时达到峰值, 进一步提升浓度可使该促进效应减弱。较高浓度 (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) ATRA 对大鼠 jBMSCs 成骨分化呈现抑制效应。研究在体外证明 ATRA 对大鼠 jBMSCs 成骨分化具双向效应, 并鉴定了 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 为大鼠 jBMSCs 成骨分化的最适浓度, 为体内研究的开展与全反式视黄酸的临床应用提供了参考依据。

[关键词] 全反式视黄酸; 颌骨; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 双向效应**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.09.003 **[中图分类号]** R782.2 **[文献标志码]** A

[基金项目] 国家自然科学基金 (82071083, 82271006); 中央高校基本科研业务费专项资金 (YG2023ZD14); 上海市自然科学基金 (21ZR1436900, 22ZR1436700); 上海市科技创新行动计划国际科技合作项目/政府间国际科技合作项目 (23410713600); 上海交通大学医学院附属第九人民医院交叉研究基金 (JYJC202116); 上海交通大学医学院生物材料与再生医学交叉研究项目 (2022LHB02); 上海交通大学医学院“双百人”项目 (20221809); 上海交通大学医学院附属第九人民医院原创项目 (JYYC003)。

[作者简介] 刘媛琪 (1996—), 女, 回族, 硕士生; 电子信箱: liuyuanqi@sjtu.edu.cn。孙思远 (1998—), 男, 硕士生; 电子信箱: ssy1412832053@163.com。*为共同第一作者。

[通信作者] 沈国芳, 电子信箱: shengf1428@sjtu.edu.cn。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (82071083, 82271006); The Fundamental Research Funds for the Central Universities (YG2023ZD14); Natural Science Foundation of Shanghai (21ZR1436900, 22ZR1436700); Shanghai Science and Technology Innovation Action Plan-International Science and Technology Cooperation Program (23410713600); Cross-Disciplinary Research Fund of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (JYJC202116); Biomaterials and Regenerative Medicine Institute Cooperative Research Project of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (2022LHB02); “Two-Hundred Talents” Program of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (20221809); Original Exploration Project of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (JYYC003)。

[Corresponding Author] SHEN Guofang, E-mail: shengf1428@sjtu.edu.cn。



Dual-directional effect of all-trans retinoic acid on osteogenic differentiation of jaw bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*

LIU Yuanqi^{1,2*}, SUN Siyuan^{1,2*}, DAI Qinggang³, JIANG Lingyong^{1,2}, SHEN Guofang¹

1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology; Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China; 2. Shanghai-New Zealand Joint Laboratory of Dentistry, Centre for Clinical and Fundamental Craniofacial Research, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200011, China; 3. Department of 2nd Dental Centre, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology; Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) of different concentrations on osteogenic differentiation of jaw bone mesenchymal stem cells (jBMSCs) in rats. **Methods** jBMSCs from 4-week-old Sprague-Dawley (SD) rats were isolated and cultured with whole bone marrow adherence method. The surface antigens were identified by using flow cytometry. Alkaline phosphatase (ALP) staining/alizarin red staining, oil red O staining and alcian blue staining were used to prove the multilineage differentiation potential of jBMSCs after osteogenic, adipogenic and chondrogenic induction respectively. jBMSCs were induced in osteogenic medium with ATRA of concentration of 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ *in vitro*, and dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control group. Cell viability of jBMSCs in different groups were determined by CCK8. ALP staining and alizarin red staining were used to investigate the osteogenic ability of jBMSCs in each group and screened the concentrations for subsequent experiments. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and immunofluorescence staining were used to analyze the expressions of osteogenesis-related genes and proteins in jBMSCs of different concentrations. **Results** The flow cytometry analysis showed that more than 98% of P1 jBMSCs were positive for CD29⁺CD90⁺CD31⁺CD45⁻, which was congruent with the characteristics of bone mesenchymal stem cells. The results of ALP staining/alizarin red staining, oil red O staining and alcian blue staining indicated that the P1 jBMSCs had the multilineage differentiation potential of osteogenesis, adipogenesis and chondrogenesis. The results of ALP staining/alizarin red staining showed that the osteogenic activity and mineralization ability of jBMSCs in 0.01, 0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA groups were increased compared with those in the control group, while the osteogenic activity and mineralization ability were decreased when the concentration of ATRA increased, especially higher than 5 $\mu\text{mol/L}$ (all $P < 0.05$). qPCR analysis showed that the mRNA expression levels of osteogenesis-related genes such as *Alp*, bone sialoprotein (*Bsp*), collagen type I $\alpha 1$ (*Col1a1*) and osteocalcin (*Ocn*) were higher in the 0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA groups compared to the control group. However, further increasing the concentration of ATRA led to a decrease in gene expression levels, and when the concentration exceeded 5 $\mu\text{mol/L}$, it began to be lower than the control group level (all $P < 0.05$). The immunofluorescence staining showed that the expression of osteogenic related proteins SP7, ALP and OCN in the 0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA groups were increased compared to the control group, while further increasing the concentration of ATRA led to a decrease in protein expression. When the concentration was higher than 5 $\mu\text{mol/L}$, it began to be lower than the control group level (all $P < 0.05$). **Conclusion** Lower concentrations (0.1, 1 $\mu\text{mol/L}$) of ATRA can promote the osteogenic differentiation of rat jBMSCs, and the promoting effect reaches its peak at 0.1 $\mu\text{mol/L}$, while the effect can be weakened by further increasing the concentration. Higher concentrations (5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$) of ATRA could inhibit the osteogenic differentiation of rat jBMSCs, showing an inhibitory effect. In this study, the dual-directional effect of retinoic acid on osteogenic differentiation of jBMSCs was demonstrated *in vitro*, and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA was identified as the optimal concentration for osteogenic differentiation of jBMSCs in rats, which provided a reference basis for the development of *in vivo* studies and clinical application of ATRA.

[Key words] all-trans retinoic acid (ATRA); jaw; bone marrow mesenchymal stem cell; osteogenic differentiation; dual-directional effect

随着人们生活水平的提高和对美的不懈追求, 颅颌面骨畸形及缺损的功能和美观重建越来越受到关注。近年来, 基于间充质干细胞的组织工程作为颅颌面骨缺损的替代疗法被广泛关注。作为第一个被报道的间充质干细胞, 长骨来源的骨髓间充质干细胞仍是用于骨骼再生最常见和最可靠的干细胞^[1]。然而, 由于发育模式和成骨方式与长骨不同, 颌骨表现出对机械和稳态刺激的离散反应^[2]。在发育模式上, 颌

骨起源于神经外胚层的神经嵴细胞, 而长骨来源于中胚层细胞; 在成骨方式上, 颌骨主要以膜内成骨为主, 而长骨经历软骨内成骨^[3]。同时, 最近的研究^[4]表明, 干细胞功能会受到组织特异性的影响。已有文献^[5]证实, 颌骨来源的骨髓间充质干细胞(jaw bone marrow mesenchymal stem cells, jBMSCs)与长骨来源的骨髓间充质干细胞之间存在功能差异。来源于上颌骨、下颌骨和牙槽骨等的jBMSCs较来源

于长骨的骨髓间充质干细胞表现出更强的增殖能力及成骨分化能力^[6],在治疗颅颌面骨畸形及缺损等疾病中可能较长骨来源的骨髓间充质干细胞更具优势。因此,如何调控jBMSCs成骨分化成为研究热点,有望为临床治疗颅颌面骨相关疾病提供理论基础。

视黄酸作为维生素A的体内代谢产物,在全身多个器官的形成中发挥着重要作用,也是调控骨生长发育的重要营养物质,其缺乏或过量都会影响骨骼系统生长发育。一方面,儿童维生素A缺乏可阻碍骨骼生长发育造成侏儒^[7]。同时,视黄酸缺乏的动物模型也表现出四肢发育畸形^[8]。研究^[9]表明,视黄酸合成限速酶视黄醛脱氢酶(retinaldehyde dehydrogenase, RALDH)缺乏导致的视黄酸合成减少小鼠表现出骨皮质增厚、骨松质密度增加,其间充质干细胞成骨能力增强,Runx2相关转录因子2(Runt-related transcription factor2, Runx2)、骨钙素(osteocalcin, Ocn)和成骨细胞特异性转录因子Sp7等成骨细胞标志基因表达水平升高。另一方面,研究^[10]发现维生素A摄入量显著增加的人体的骨骼效应,包括骨骺过早闭合、骨骼和关节疼痛、皮质骨吸收增加及骨形成异常等。高维生素A血症大鼠表现为骨质变薄和矿化增强导致的骨骼脆性增加,免疫组织化学结果显示骨髓及骨内膜区域细胞OCN、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)和基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)呈阳性,且该区域组织成骨标志基因碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, Alp)及Runx2表达水平升高^[11]。目前,视黄酸对骨骼的影响主要聚焦于长骨,而在颌骨中的作用尚不清楚。此外,之前的体外研究主要以视黄酸对成骨/成骨前体细胞系的作用为主^[12],而其在骨髓间充质干细胞成骨分化中的作用还鲜有报道。因此,本文通过体外细胞及分子生物学实验初步探究不同浓度全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, ATRA)对大鼠jBMSCs成骨分化能力的影响,为体内研究的开展和阐明视黄酸在颌骨中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4周龄Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠25只,购置于上海吉辉实验动物饲养有限公司,饲养于上海交通大学医学院附属第九人民医院无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级动物房,饲养温度

(24±2) °C, 12 h昼夜更替,自由饮食。实验小鼠生产许可证号为SCXK(苏)2023-0009,使用许可证号为SYXK(沪)2020-0025。

1.2 主要试剂与仪器

MEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)、青霉素/链霉素溶液、胰蛋白酶(Gibco, 美国),4%多聚甲醛(武汉赛维尔生物科技有限公司,中国),ATRA(MCE, 美国),大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导分化试剂盒、大鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化试剂盒、大鼠骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化试剂盒(Cyagen, 美国),TRIzol Reagent、反转录试剂盒(TaKaRa, 日本),SYBR Green Fast qPCR Mix、抗CD31抗体、抗ALP抗体、抗OCN抗体(ABclonal, 美国),抗CD29抗体、抗CD45抗体、抗CD90抗体(BioLegend, 美国),抗SP7抗体(Abcam, 美国),二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、CCK8检测试剂盒、ALP染色试剂盒、茜素红染色试剂盒、油红O染色试剂盒、免疫染色封闭液、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG(H+L)(A0208)、HRP标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)(A0216)(上海碧云天生物技术有限公司,中国),阿尔辛蓝染色液(pH=2.5)(北京索莱宝科技有限公司,中国)。PCR仪(Roche, 瑞士),体视显微镜、荧光显微镜(Olympus, 日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠jBMSCs分离、培养及传代 二氧化碳(carbon dioxide, CO₂)安乐死雄性SD大鼠4只,参照课题组前期方法^[13-14]获取下颌骨,去除肌肉组织,置于含PBS的培养皿中。取第一磨牙近中至第三磨牙远中骨段,用1 mL注射器吸取MEM完全培养基(含10%FBS、1%青霉素/链霉素溶液)多次冲洗下颌骨髓腔直至发白。收集冲洗液250×g离心5 min后弃上清液,重悬于MEM完全培养基中,而后接种至10 cm培养皿内,轻轻摇匀,5%CO₂、37 °C培养。第3日弃去一半培养基,并加入等量新鲜完全培养基。之后每3 d换液1次。待细胞融合度达70%~80%时加入胰蛋白酶液消化,随后使用等量完全培养基中和。接着,用吹打的方式将细胞分散,并转移至离心管

150×g 离心 5 min。弃上清液，重悬，铺于 10 cm 培养皿中传代。待细胞融合度再次达 70%~80% 时，取 P1 代细胞铺板用于后续实验。

1.3.2 流式细胞术 取 P1 代细胞置于 PBS 中，450×g 离心 5 min 弃上清液。随后用流式染色缓冲液重悬细胞，并将其均分为 4 组，每组约 10⁵ 个细胞。而后分别使用抗 CD29、CD45、CD90 和 CD31 抗体 4 °C 孵育 30 min。再次以 450×g 离心 5 min 后，用流式染色缓冲液清洗。最后，将清洗后的细胞重悬，上机检测并分析。

1.3.3 CCK8 实验 分别使用 ATRA 浓度为 0.01、0.1、1、5、10、20 μmol/L 的培养基培养 P1 代 jBMSCs，同时用含有 1 μL/mL DMSO 的培养基作为对照组。培养 48 h 后，向各培养基中加入 CCK8 试剂，继续孵育 1 h。随后，通过酶标仪检测 450 nm 处吸光度并参阅文献计算相对活细胞数^[15]。

1.3.4 骨髓间充质干细胞成骨诱导分化 参考文献中成骨诱导方法^[16]，取 P1 代细胞以 5×10⁴ 个/mL 密度铺板。待细胞贴壁后，分别使用 ATRA 浓度为 0.01、0.1、1、5、10、20 μmol/L 的大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导液进行成骨分化诱导。同时用含有 1 μL/mL DMSO 的大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导液作为对照组。2 d 换液 1 次。成骨诱导 7 d 后，进行 ALP 染色（见“1.3.8”）、免疫荧光染色（见“1.3.9”）和成骨相关基因表达水平检测。成骨诱导 14 d 后，进行茜素红染色（见“1.3.10”）。

1.3.5 骨髓间充质干细胞成脂诱导分化 参考文献中成脂诱导方法^[17]，按照说明书配制大鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基 A 液和 B 液。取 P1 代细胞以 5×10⁴ 个/mL 密度铺于 96 孔板中。待细胞贴壁融合度达到 100% 时，吸去完全培养基，每孔加入 A 液 100 μL。诱导 2 d 后，吸去 A 液，加入 B 液 100 μL。维持 1 d 后，吸去 B 液，换回 A 液进行诱导。A 液和 B 液交替使用，待显微镜下观察到大量脂滴时停止诱导，进行油红 O 染色（见“1.3.11”）。

1.3.6 骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化 参考文献中成软骨诱导方法^[14]，按照说明书配制大鼠骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化预混液和成软骨诱导分化完全培养基。取 4×10⁵ 个 P1 代细胞于 15 mL 离心管中，20 °C、250×g 离心 4 min。吸去上清液，加入 0.5 mL 预混液重悬细胞，然后以 20 °C、150×g 离心 5 min。再次重复清洗细胞。弃去上清液，用 0.5 mL 成软骨诱导分化完全培养基重悬细胞，随后以 20 °C、150×g 离心 5 min。拧松离心管盖以便气体交换，将离心管竖立放置于培养箱中培养。待 24~48 h 后，细胞出现聚团现象时，轻弹离心管底部使软骨球脱离管底悬浮于液体中。此后，每隔 3 d 更换 1 次新鲜成软骨诱导分化完全培养基。持续诱导 21 d，直至管内形成直径 1.5~2 mm 的软骨球，即可准备切片染色（见“1.3.12”）。

1.3.7 RNA 提取、反转录及实时荧光定量聚合酶链式反应 弃去培养孔板中培养液后，使用 PBS 洗涤细胞。24 孔板每孔加入 500 μL TRIzol 裂解细胞，并将裂解后的细胞混合物收集于无酶 Eppendorf 管中。接着加入 100 μL 氯仿，轻轻混匀后静置 3 min，4 °C、10 000×g 离心 15 min。随后小心吸取最上层无色水相液体，加入等量异丙醇，摇匀后静置 10 min。再次以 4 °C 10 000×g 离心 10 min，以沉淀 RNA。弃上清液，加入适量无酶无菌水配制的 75% 乙醇洗涤，4 °C 10 000×g 离心 15 min。重复洗涤 2 次后弃上清液，在通风橱中干燥 RNA 沉淀。用 20 μL 无酶无菌水充分溶解沉淀。使用超微量紫外分光计测定 RNA 浓度。利用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA 后，使用 SYBR Green Fast qPCR Mix 试剂盒进行实时荧光定量聚合酶链反应（quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR），以检测成骨相关基因 *Alp*、骨唾液酸蛋白（bone sialoprotein, *Bsp*）、I 型胶原蛋白 α1（collagen type I α1, *Colla1*）、*Ocn* 的表达，根据课题组前期方法^[18] 分析数据。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列信息

Tab 1 Primer sequences for qPCR

Gene	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')
β-actin	CCCATACCCACCATCACACC	CACCCGCGAGTACAACCTTC
<i>Alp</i>	TATGTCTGGAACCGCACTGAAC	CACTAGCAAGAAGAAGCCTTTGG
<i>Bsp</i>	CCAGAAAGAGCAGCACGGTTGAG	TGACCCTCGTAGCCTTCATAGCC
<i>Colla1</i>	CAGGCTGGTGTGATGGGATT	CCAAGGTCTCCAGGAACACC
<i>Ocn</i>	GAATAGACTCCGGCGCTACC	AGCTCGTCACAATTGGGGTT

1.3.8 ALP 染色 使用含有上述浓度的 ATRA 成骨诱导液分别诱导 jBMSCs 成骨分化 7 d 后, 吸去 96 孔板中原有培养基, 用 PBS 轻轻洗涤 3 次。随后, 加入 4% 多聚甲醛固定 5 min, 再用 PBS 清洗 3 次。接着每孔加入 80 μ L 按照说明书配制好的 ALP 染色液, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下避光孵育约 5 min。最后使用双蒸水冲洗以终止染色反应。体视显微镜下可见 ALP 阳性细胞呈蓝紫色, 拍照记录。

1.3.9 免疫荧光染色 根据文献方法^[19], 用含有上述浓度的 ATRA 成骨诱导液诱导 jBMSCs 成骨分化 7 d, 吸去 96 孔板中原有培养基, PBS 轻轻洗涤 3 次后加入 4% 多聚甲醛固定 20 min, 再用 PBS 清洗 3 次后, 室温封闭 1 h, 孵育一抗 (SP7、ALP、OCN, 1:500), 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 清洗后, 室温使用相应二抗 [HRP 标记的山羊抗兔 IgG (H+L)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L), 1:1 000] 孵育 1 h, PBS 清洗后 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色 10 min, 再次用 PBS 清洗后, 于荧光显微镜下拍照。

1.3.10 茜素红染色 用含有上述浓度的 ATRA 成骨诱导液分别诱导 jBMSCs 成骨分化 14 d 后, 吸去 96 孔板中原有培养基, 用 PBS 轻轻洗涤 1 次。随后, 加入按照说明书配置好的固定液固定 20 min, 再用 PBS 冲洗 3 次。接着每孔加入 80 μ L 茜素红染色液染色 20 min, 再用双蒸水冲洗 1 次。体视显微镜下可见红色矿化结节, 拍照记录。

1.3.11 油红 O 染色 吸去 96 孔板中的成脂诱导分化完全培养基, PBS 轻柔洗涤 3 次后每孔加入 4% 多聚甲醛溶液 100 μ L 固定 20 min。将油红 O 储存液和蒸馏水按照 2:3 比例混合配制为工作液后过滤。吸去固定液, PBS 轻柔洗涤 3 次后每孔加入 100 μ L 油红 O 工作液, 室温染色 30 min。吸去染色液, PBS 轻柔洗涤 3 次后于体视显微镜下可见红色脂滴, 拍照。

1.3.12 软骨球切片及阿尔辛蓝染色 将诱导形成的软骨球用 PBS 清洗后, 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min, 分别浸泡于 50%、70%、80%、95% 乙醇和无水乙醇中脱水各 30 min。再用二甲苯和无水乙醇 1:1 混匀浸泡 2 h。接着, 将软骨球在二甲苯中浸泡 2 次, 每次 1 h, 进行透明。将二甲苯和石蜡按 1:1 混匀, 将软骨球浸泡其中放于 40 $^{\circ}$ C 烘箱中 40 min 后, 浸泡于纯石蜡中, 55 $^{\circ}$ C 烘箱放置 30 min。将软骨球取出, 进行包埋后切片。将切片分别浸于二甲苯、无水乙醇, 以

及 95%、85%、70% 和 50% 乙醇中各 10 min, 晾干。在晾干的切片上滴加阿尔辛蓝染液, 37 $^{\circ}$ C 染色 1 h 后, 自来水冲洗 5 min, 晾干。体视显微镜下可见组织内大量蓝色酸性黏多糖, 拍照。

1.4 统计学分析

使用 SPSS 24.0 软件进行数据统计分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 *t* 检验进行组间比较。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 jBMSCs 提取及鉴定

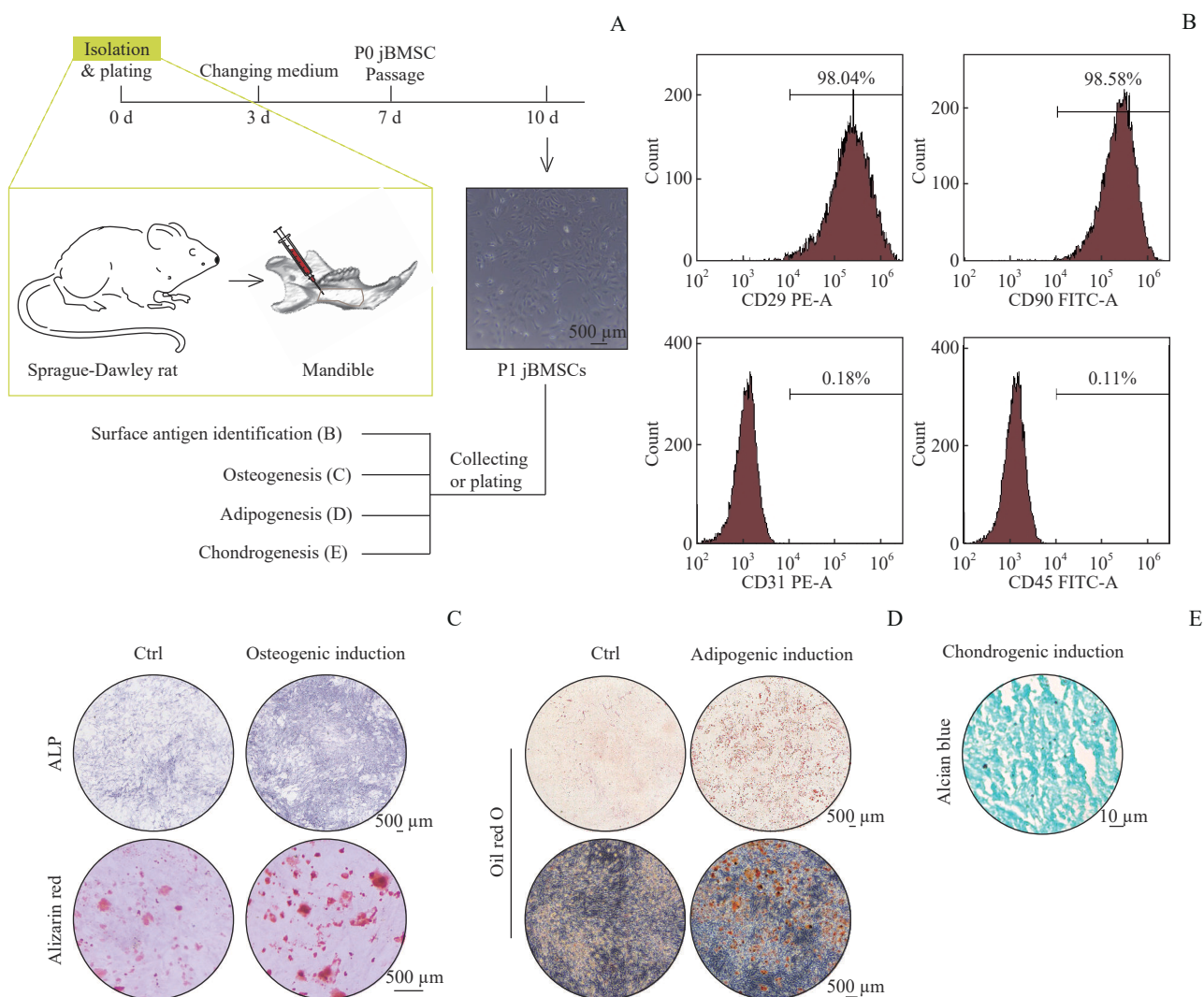
通过全骨髓贴壁法提取 jBMSCs 并用流式细胞术对 P1 代 jBMSCs 进行骨髓间充质干细胞表面抗原鉴定 (图 1A)。结果显示, 98% 以上的细胞表现为 CD29⁺CD90⁺CD31⁻CD45⁻ (图 1B), 符合骨髓间充质干细胞的特点。分别对成骨诱导 7 d 和 14 d 的 P1 代 jBMSCs 进行 ALP 染色和茜素红染色, 发现诱导组 ALP 染色和茜素红染色较对照组均明显增强 (图 1C)。成脂诱导 5 d 后, 油红 O 染色显示诱导组有明显的脂滴生成 (图 1D)。同时, 成软骨诱导 21 d 后形成软骨球, 石蜡切片显示阿尔辛蓝染色阳性 (图 1E)。以上结果说明 jBMSCs 具有成骨、成脂、成软骨多向分化的潜能。

2.2 ATRA 对 jBMSCs 细胞毒性的分析

使用 CCK8 法检测不同浓度 ATRA 对 jBMSCs 细胞活性的影响。CCK8 分析显示, 0.01、0.1、1、5、10、20 μ mol/L ATRA 处理 48 h 后, jBMSCs 存活率较对照组差异无统计学意义 (图 2), 表明以上浓度 ATRA 对 jBMSCs 无明显细胞毒性。

2.3 ATRA 对 jBMSCs 成骨分化的影响

分别使用含有 ATRA 浓度为 0.01、0.1、1、5、10、20 μ mol/L 的成骨诱导液对 P1 代 jBMSCs 成骨诱导 7 d 后进行 ALP 染色。与对照组相比, 0.01、0.1、1 μ mol/L ATRA 组 jBMSCs 的 ALP 活性增强, 且在 0.1 μ mol/L 浓度时达到峰值, 而 5、10、20 μ mol/L ATRA 组 ALP 活性下降, 且差异有统计学意义 (均 *P* < 0.05) (图 3A)。成骨诱导 14 d 后进行茜素红染色, 结果 (图 3B) 显示, 与对照组相比, 0.01、0.1、1 μ mol/L ATRA 组 jBMSCs 矿化结节形成能力增强,



Note: A. Schematic diagram of the isolation and identification of jBMSCs. B. Surface antigen identification of P1 jBMSCs. PE—phycoerythrin; FITC—fluorescein isothiocyanate. C. Osteogenic differentiation potential of P1 jBMSCs. D. Adipogenic differentiation potential of P1 jBMSCs. E. Chondrogenic differentiation potential of P1 jBMSCs.

图1 jBMSCs 的培养及鉴定

Fig 1 Culture and identification of jBMSCs

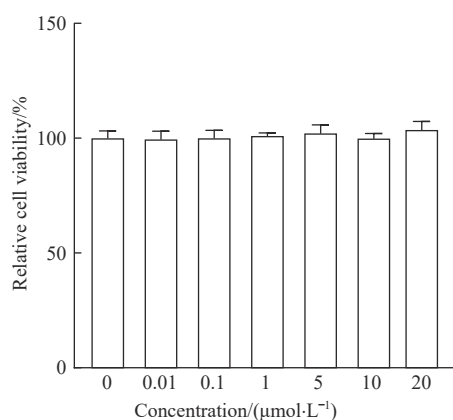
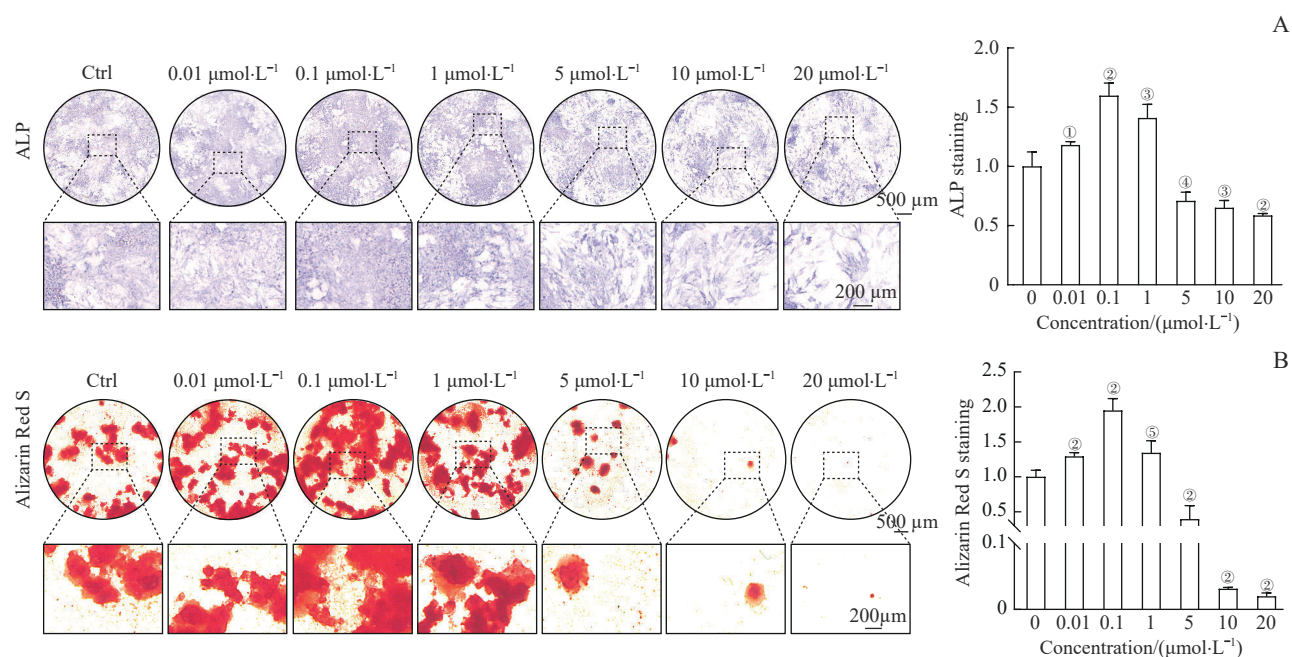


图2 ATRA 对 jBMSCs 细胞活性的影响

Fig 2 Effect of ATRA on the cell viability of jBMSCs

且在 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 浓度时达到峰值, 而 5 、 10 、 $20 \mu\text{mol/L}$ ATRA 组矿化结节形成能力下降, 且差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 说明较低浓度 (0.01 、 0.1 、 $1 \mu\text{mol/L}$) ATRA 可增强 jBMSCs 成骨分化能力, 而较高浓度 (5 、 10 、 $20 \mu\text{mol/L}$) ATRA 抑制 jBMSCs 成骨分化。此外, 与对照组相比, 不论是 $0.01 \mu\text{mol/L}$ 组还是 $1 \mu\text{mol/L}$ 组 ALP 活性及矿化结节形成能力均明显弱于 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 组, 且差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 可认为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ ATRA 是促进 jBMSCs 成骨分化的最适浓度。因此, 后续实验均选取 0.1 、 1 、 5 、 10 、 $20 \mu\text{mol/L}$ 组作为实验组研究 ATRA 对 jBMSCs 成骨分化过程中成骨相关基因及蛋白表达的影响。



Note: A. ALP staining and quantitative analysis. B. Alizarin Red S staining and quantitative analysis. ① $P=0.012$, ② $P=0.000$, ③ $P=0.001$, ④ $P=0.002$, ⑤ $P=0.004$, compared with the control group ($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

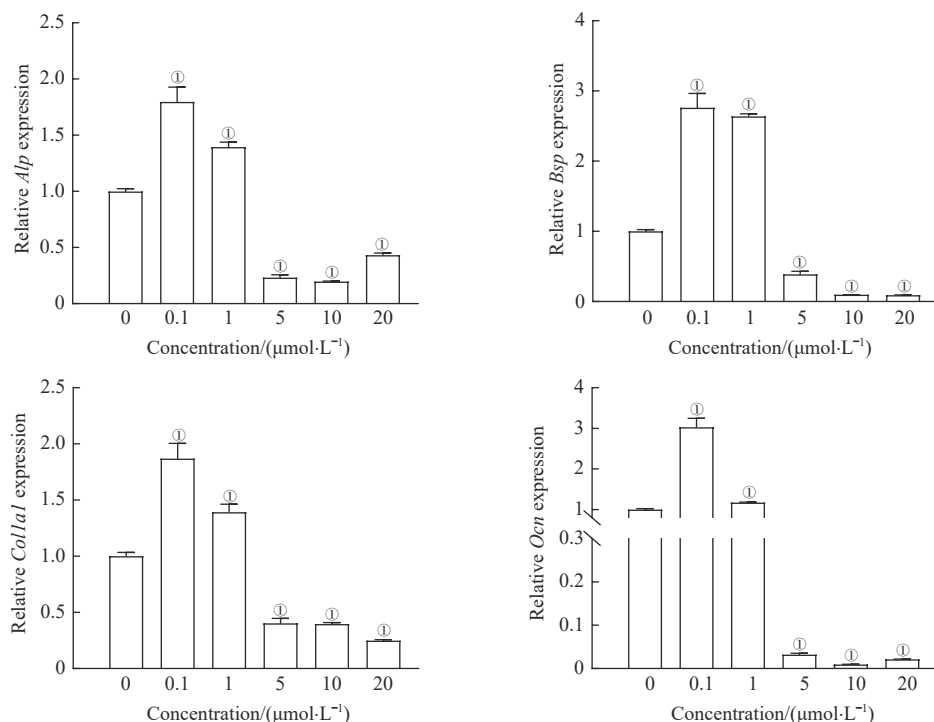
图3 ATRA对jBMSCs成骨分化能力的影响

Fig 3 Effect of ATRA on osteogenic differentiation ability of jBMSCs

2.4 ATRA对jBMSCs成骨相关基因表达的影响

利用qPCR对不同浓度ATRA条件下成骨诱导7 d后的P1代jBMSCs进行成骨相关基因表达水平检测。结果(图4)显示,与对照组相比,0.1、1 $\mu\text{mol/L}$

ATRA组jBMSCs成骨相关基因 *Alp*、*Bsp*、*Colla1*、*Ocn* 表达水平显著上升,而5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA组jBMSCs成骨相关基因 *Alp*、*Bsp*、*Colla1*、*Ocn* 表达水平显著下降,且差异具有统计学意义($P=$



Note: ① $P=0.000$, compared with the control group ($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

图4 ATRA对jBMSCs成骨相关基因表达的影响

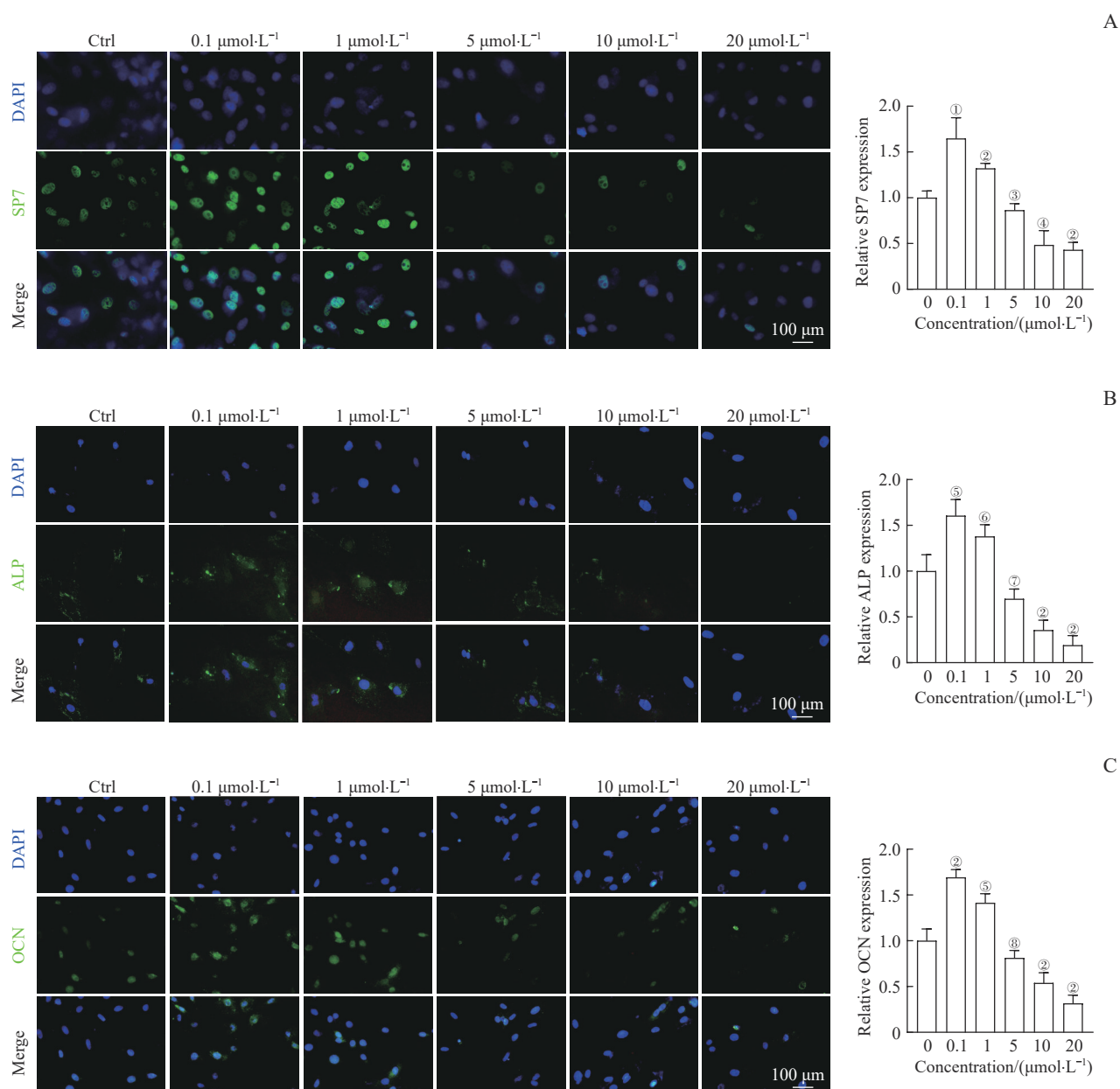
Fig 4 Effect of ATRA on osteoblast-related gene expression in jBMSCs

0.000); 提示较低浓度 ATRA (0.1、1 $\mu\text{mol/L}$) 促进 jBMSCs 成骨相关基因表达, 而较高浓度 ATRA (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 抑制 jBMSCs 成骨相关基因表达。

2.5 ATRA 对 jBMSCs 成骨相关蛋白表达的影响

利用细胞免疫荧光染色对不同浓度 ATRA 条件下成骨诱导 7 d 后的 P1 代 jBMSCs 进行成骨相关蛋白表达水平检测。结果 (图 5) 显示, 与对照组相比,

0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组 jBMSCs 成骨相关蛋白 SP7、ALP 和 OCN 表达增强, 而 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组 jBMSCs 成骨相关蛋白 SP7、ALP 和 OCN 表达减弱, 且差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$), 与 qPCR 结果相符; 说明较低浓度 ATRA (0.1、1 $\mu\text{mol/L}$) 上调 jBMSCs 成骨相关蛋白表达水平, 而较高浓度 ATRA (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 抑制 jBMSCs 成骨相关蛋白表达水平。



Note: A. SP7 immunofluorescence staining and quantitative analysis. B. ALP immunofluorescence staining and quantitative analysis. C. OCN immunofluorescence staining and quantitative analysis. ^① $P=0.003$, ^② $P=0.000$, ^③ $P=0.017$, ^④ $P=0.002$, ^⑤ $P=0.001$, ^⑥ $P=0.005$, ^⑦ $P=0.012$, ^⑧ $P=0.026$, compared with the control group (0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

图5 ATRA对jBMSCs成骨相关蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of ATRA on osteoblast-related protein expression in jBMSCs

3 讨论

外伤、唇腭裂、骨性错颌畸形及各种综合征是导致颅颌面骨畸形和缺损的重要原因。临床上,唇腭裂患者常伴发牙槽突裂。为了恢复牙弓稳定性和为牙萌出提供良好的骨基础,常用髁骨对牙槽突裂进行移植修复。然而,有研究^[20]证实,下颌骨移植优于髁骨移植,表现出相容性更好、骨吸收更少等特点。这种差异可能归因于颌骨等颅颌面骨和髁骨等中轴附肢骨骼不同的胚胎起源及发育方式。在发育过程中,颅颌面骨起源于腹外侧迁移至鳃弓的来自神经外胚层的神经嵴细胞,并经历膜内成骨形成颅颌面骨结构,而中轴附肢骨骼来源于中胚层,成骨方式主要以软骨内成骨为主^[4]。此外,两者在生物力学方面也具有一定差异。中轴附肢骨骼在行使直立或行走等生理功能时所承受的力几乎是咀嚼时牙槽骨所受力的一半,这可能是巨颌症、双膦酸盐相关性颌骨坏死仅影响颌骨的原因^[21]。细胞层面上,两者都符合间充质干细胞的特点,高表达CD20、CD44、CD90等细胞表面抗原,而低表达CD45、CD31、CD34、CD11b等细胞表面抗原^[22]。然而,两者在生物学特性上具有一定区别。越来越多的研究^[23-24]表明,与长骨相比,jBMSCs具有部位特异性,具体表现为更强的自我更新、成骨和成血管能力,且细胞衰老速度更缓慢,而在成脂及成软骨能力方面较弱。最新研究^[17]发现,Fat4⁺细胞亚群在牙槽骨而非长骨中特异性富集,且该细胞亚群具有集落形成以及成骨和成脂分化能力,说明颌骨可能存在特异性干细胞亚群,造成了其与长骨在某些生物学特征上的差异。视黄酸作为维生素A在体内的代谢产物,不仅影响长骨生长发育,在颅颌面骨生长发育中也表现出重要的作用。一方面,人类胚胎期维生素A缺乏,以及动物维生素A或视黄酸合成限速酶RALDH10缺乏均表现出唇裂、腭裂及颅面骨发育异常等^[25-26]。此外,在小牛中,视黄酸缺乏可导致颅面骨骨吸收和膜内成骨异常,并以下颌骨内侧缘表现最为显著^[27]。另一方面,孕妇维生素A摄入过量或暴露于过量视黄酸类似物会导致小耳畸形、眼距过宽、腭裂、唇裂、小颌畸形和面中部发育不全等颅颌面发育异常、复杂的先天性心脏病和中枢神经系统异常^[28]。同时,视黄酸过量或当细胞色素P450酶系26(cytochrome P450 family 26 enzyme, CYP26)基因突变/敲除使视黄酸不能正常降解而在细胞内堆积时,

同样会使胎儿及小鼠胚胎出现颅缝早闭、颅骨形成不全等颅颌面骨发育畸形表现^[29]。然而,视黄酸对长骨及颌骨的作用之间是否存在差异仍不清楚。此外,视黄酸缺乏或过多均会引起颅颌面骨畸形,但其具体调控机制尚不明确,有必要通过条件性基因敲除小鼠进一步研究。

鉴于视黄酸在骨骼中的重要作用,许多学者对其在成骨分化中的作用进行了体外研究。结果显示,不同浓度视黄酸对成骨细胞及其前体细胞的分化能力表现出多样性。一方面,部分研究^[12]表明,ATRA在纳摩尔浓度下抑制成骨分化,而在微摩尔浓度下促进成骨分化。OHISHI等^[30]发现1 nmol/L ATRA抑制胎鼠颅骨原代成骨细胞ALP活性、骨矿化结节形成及成骨相关基因骨 γ -羧基谷氨酸蛋白(bone γ -carboxyglutamate protein, *Bglap*)表达水平。人类成骨细胞前成骨细胞系(SV-HFO)在100 nmol/L ATRA条件下也观察到类似结果^[31]。此外,400 nmol/L ATRA抑制人原代成骨细胞和成骨前体细胞系(MC3T3-E1)的矿化能力,并且对MC3T3-E1细胞的影响主要与成骨相关基因*Alp*、*Bglap*、*Runx2*和*Sp7*相关^[32]。而使用1 μ mol/L ATRA处理大鼠成骨细胞系导致ALP活性增强,且成骨相关基因*Colla1*表达上调。同时,1 μ mol/L浓度的ATRA可促进小鼠间充质干细胞细胞系(C3H10 T1/2)成骨相关基因*Alp*、*Runx2*和整合素结合唾液酸蛋白(integrin binding sialoprotein, *Ibsp*)的表达并促进其矿化^[33]。另一方面,也有研究^[34]表明,5、10 μ mol/L ATRA可抑制小鼠原代成骨细胞和MC3T3-E1的ALP活性及矿化能力,并且下调成骨相关基因*Alp*、*Bglap*、*Colla1*的表达。以上研究大多局限于视黄酸对原代成骨细胞/成骨细胞系以及成骨前体细胞系的研究,而其对于骨髓间充质干细胞作用的研究还较罕见。本研究成功分离并培养大鼠jBMSCs,并发现ATRA在0.01、0.1、1 μ mol/L浓度下促进jBMSCs成骨分化,且该促进效应在0.1 μ mol/L浓度达到峰值,而在5、10、20 μ mol/L浓度下抑制jBMSCs成骨分化,说明ATRA对jBMSCs成骨分化的调控存在双向效应。之前的研究对于视黄酸在成骨分化中的作用表现出相互矛盾的结果,可能正是由于视黄酸在此过程中的双向效应导致的。

维生素A摄入过多会引起以眩晕、呕吐、腹泻、头痛、抽搐和皮肤脱皮为特征的疾病。可见,维生素A及视黄酸维持在正常生理水平是机体代谢所必需

的。然而,目前还没有敏感、有效的方法确切评估机体的维生素A状况。事实上,视黄酸常作为药物治疗痤疮及多种癌症,包括急性早幼粒细胞白血病、卡波西肉瘤、头颈部鳞状细胞癌、卵巢癌和神经母细胞瘤等^[35]。因此,将视黄酸用于疾病治疗的过程中应注意监测患者其他系统的不良反应,做到安全、合理、高效用药。

综上,本研究利用课题组前期方法成功分离培养了大鼠jBMSCs,在体外进行成骨诱导,利用ALP染色、茜素红染色、qPCR及免疫荧光染色等实验分析了不同浓度ATRA对大鼠jBMSCs成骨活性、矿化能力,以及成骨相关基因mRNA和蛋白表达水平的影响。研究表明,较低浓度(0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$) ATRA促进大鼠jBMSCs成骨分化能力,且该效应在0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时达到峰值,而较高浓度(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) ATRA抑制大鼠jBMSCs成骨分化能力,说明全反式视黄酸对大鼠jBMSCs成骨分化的调控具有双向效应。本研究为体内研究的开展与视黄酸的临床应用提供了参考依据。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者均声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学医学院附属第九人民医院医学伦理委员会的审核批准(批件号:SH9H-2022-A108-SB)。所有实验过程均遵守《关于善待实验动物的指导性意见》。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by the Medical Ethics Committee of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (NO. SH9H-2022-A108-SB). All experimental animal protocols were carried out by following the guidelines of *Instructive Notions with Respect to Caring for Laboratory Animals*.

作者贡献/Authors' Contributions

刘媛琪负责实验、数据整理和分析、论文撰写;孙思远参与实验分析;代庆刚负责论文修改;江凌勇、沈国芳负责实验设计指导、论文修改。所有作者均阅读并同意最终稿件的提交。

The experiment, data compilation and analysis, and paper writing were completed by LIU Yuanqi. The participation in the experimental analysis were done by SUN Siyuan. The paper revision was done by DAI Qinggang. The study was designed and directed by JIANG Lingyong and SHEN Guofang. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2024-04-03
- Accepted: 2024-04-25
- Published online: 2024-09-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] FU X R, LIU G, HALIM A, et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 784.
- [2] SON C, CHOI M S, PARK J C. Different responsiveness of alveolar bone and long bone to epithelial-mesenchymal interaction-related factor[J]. *JBM Plus*, 2020, 4(8): e10382.
- [3] WANG D, GILBERT J R, ZHANG X, et al. Calvarial *versus* long bone: implications for tailoring skeletal tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2020, 26(1): 46-63.
- [4] SOARES A P, FISCHER H, AYDIN S, et al. Uncovering the unique characteristics of the mandible to improve clinical approaches to mandibular regeneration[J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1152301.
- [5] JEYARAMAN M, VERMA T, JEYARAMAN N, et al. Is mandible derived mesenchymal stromal cells superior in proliferation and regeneration to long bone-derived mesenchymal stromal cells? [J]. *World J Methodol*, 2023, 13(2): 10-17.
- [6] HUANG X Y, LOU Y X, DUAN Y H, et al. Biomaterial scaffolds in maxillofacial bone tissue engineering: a review of recent advances[J]. *Bioact Mater*, 2024, 33: 129-156.
- [7] CAPUTO M, PIGNI S, AGOSTI E, et al. Regulation of GH and GH signaling by nutrients[J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1376.
- [8] KNUDSEN T B, PIERRO J D, BAKER N C. Retinoid signaling in skeletal development: scoping the system for predictive toxicology[J]. *Reprod Toxicol*, 2021, 99: 109-130.
- [9] NALLAMSHETTY S, WANG H, RHEE E J, et al. Deficiency of retinaldehyde dehydrogenase 1 induces BMP2 and increases bone mass *in vivo*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71307.
- [10] SALTZMAN M D, KING E C. Central physeal arrests as a manifestation of hypervitaminosis A[J]. *J Pediatr Orthop*, 2007, 27(3): 351-353.
- [11] LIND T, LIND P M, JACOBSON A, et al. High dietary intake of retinol leads to bone marrow hypoxia and diaphyseal endosteal mineralization in rats[J]. *Bone*, 2011, 48(3): 496-506.
- [12] SKALNY A V, ASCHNER M, TSATSAKIS A, et al. Role of vitamins beyond vitamin D3 in bone health and osteoporosis (Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2024, 53(1): 9.
- [13] XU H Y, ZHOU S R, QU R Y, et al. Icarin prevents oestrogen deficiency-induced alveolar bone loss through promoting osteogenesis via STAT3[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(2): e12743.
- [14] HONG Y Y, XU H Y, YANG Y L, et al. Isolation and cultivation of mandibular bone marrow mesenchymal stem cells in rats[J]. *J Vis Exp*, 2020, (162). DOI: 10.3791/61532.
- [15] WANG S Y, MA Y N, WANG X D, et al. IL-17A increases multiple myeloma cell viability by positively regulating syk expression[J]. *Transl Oncol*, 2019, 12(8): 1086-1091.
- [16] JIN A, HONG Y, YANG Y, et al. FOXO3 mediates tooth movement by regulating force-induced osteogenesis[J]. *J Dent Res*, 2022, 101(2): 196-205.
- [17] JIN A, XU H, GAO X, et al. ScRNA-seq reveals a distinct osteogenic progenitor of alveolar bone[J]. *J Dent Res*, 2023, 102(6): 645-655.
- [18] ZHOU S R, DAI Q G, HUANG X R, et al. STAT3 is critical for skeletal development and bone homeostasis by regulating osteogenesis[J]. *Nat*

- Commun, 2021, 12(1): 6891.
- [19] GONG X Y, SUN S Y, YANG Y L, et al. Osteoblastic STAT3 is crucial for orthodontic force driving alveolar bone remodeling and tooth movement[J]. J Bone Miner Res, 2023, 38(1): 214-227.
- [20] GUO J X, YAO H, LI X, et al. Advanced Hydrogel systems for mandibular reconstruction[J]. Bioact Mater, 2023, 21: 175-193.
- [21] AGHALOO T L, CHAICHANASAKUL T, BEZOUGLAIA O, et al. Osteogenic potential of mandibular vs. long-bone marrow stromal cells[J]. J Dent Res, 2010, 89(11): 1293-1298.
- [22] NING K T, YANG B Q, CHEN M, et al. Functional heterogeneity of bone marrow mesenchymal stem cell subpopulations in physiology and pathology[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(19): 11928.
- [23] 李天琪, 孟祥博, 时权, 等. 颌骨骨髓间充质干细胞生物学特性及其影响因素的研究进展[J]. 中华口腔医学杂志, 2022, 57(1): 107-112.
- LI T Q, MENG X B, SHI Q, et al. Research progress in biological characteristics and influencing factors of jaw bone marrow mesenchymal stem cell[J]. Chinese Journal of Stomatology, 2022, 57(1): 107-112.
- [24] SRINIVASAN A, TEO N, POON K J, et al. Comparative craniofacial bone regeneration capacities of mesenchymal stem cells derived from human neural crest stem cells and bone marrow[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2021, 7(1): 207-221.
- [25] WILLIAMS A L, BOHNSACK B L. What's retinoic acid got to do with it? Retinoic acid regulation of the neural crest in craniofacial and ocular development[J]. Genesis, 2019, 57(7/8): e23308.
- [26] PETRELLI B, BENDELAC L, HICKS G G, et al. Insights into retinoic acid deficiency and the induction of craniofacial malformations and microcephaly in fetal alcohol spectrum disorder[J]. Genesis, 2019, 57(1): e23278.
- [27] HAYES K C, COUSINS R J. Vitamin A deficiency and bone growth[J]. Calcif Tissue Res, 1970, 6(1): 120-132.
- [28] ABADIE R B, STAPLES A A, LAUCK L V, et al. Vitamin A-mediated birth defects: a narrative review[J]. Cureus, 2023, 15(12): e50513.
- [29] TIMBERLAKE A T, MCGEE S, ALLINGTON G, et al. De novo variants implicate chromatin modification, transcriptional regulation, and retinoic acid signaling in syndromic craniosynostosis[J]. Am J Hum Genet, 2023, 110(5): 846-862.
- [30] OHISHI K, NISHIKAWA S, NAGATA T, et al. Physiological concentrations of retinoic acid suppress the osteoblastic differentiation of fetal rat calvaria cells *in vitro*[J]. Eur J Endocrinol, 1995, 133(3): 335-341.
- [31] YEE M M F, CHIN K Y, IMA-NIRWANA S, et al. Vitamin A and bone health: a review on current evidence[J]. Molecules, 2021, 26(6): 1757.
- [32] LIND T, SUNDQVIST A, HU L J, et al. Vitamin A is a negative regulator of osteoblast mineralization[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82388.
- [33] ALLOISIO G, CIACCIO C, FASCIGLIONE G F, et al. Effects of extracellular osteoanabolic agents on the endogenous response of osteoblastic cells[J]. Cells, 2021, 10(9): 2383.
- [34] MATTINZOLI D, MESSA P, CORBELLI A, et al. A novel model of *in vitro* osteocytogenesis induced by retinoic acid treatment[J]. Eur Cell Mater, 2012, 24: 403-425.
- [35] NI X L, HU G H, CAI X. The success and the challenge of all-trans retinoic acid in the treatment of cancer[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019, 59(sup1): S71-S80.

[本文编辑] 包 玲

“双一流”暨高水平地方高校建设项目

一流学科——临床医学

面向人民健康重大需求, 聚焦学科前沿发展方向, 推动多学科联合攻关, 以学科特色为导向深化临床科研支撑体系建设, 推动转化医学大科学设施高效运行, 重点打造特色鲜明、引领全国、具有全球影响力的若干学科领域方向。针对危害我国人民健康的重大疾病, 围绕全生命周期健康管理、恶性肿瘤精准治疗和临床诊治技术突破3个重点领域, 开展“一流学科培优行动”, 全面激发学科发展新动力, 为全方位、全周期维护和保障人民健康贡献智慧并提供优质服务。力争成为顶尖名医大师集聚地、卓越医学人才培养地、原始创新策源地和成果转化应用高产地, 学科整体实力继续保持全国领先优势, 跻身国际一流。

